









BIOCOMPATIBLE POLYORGANOSILOXANE COMPOSITION FOR CELL CULTURE APPARATUS

Patent number: WO8808789
Publication date: 1988-11-17
Inventor: BANES ALBERT J (US)
Applicant: BANES ALBERT J (US)
Classification:
 - international: B32B3/12
 - european: A61L27/18; C08J7/14; C12M1/20; C12N5/00S; G01N33/543F; G01N33/545
Application number: WO1988US01459 19880503
Priority number(s): US19870046440 19870504

Also published as:

 EP0365536 (A)
 US4789601 (A)
 EP0365536 (B)

Cited documents:

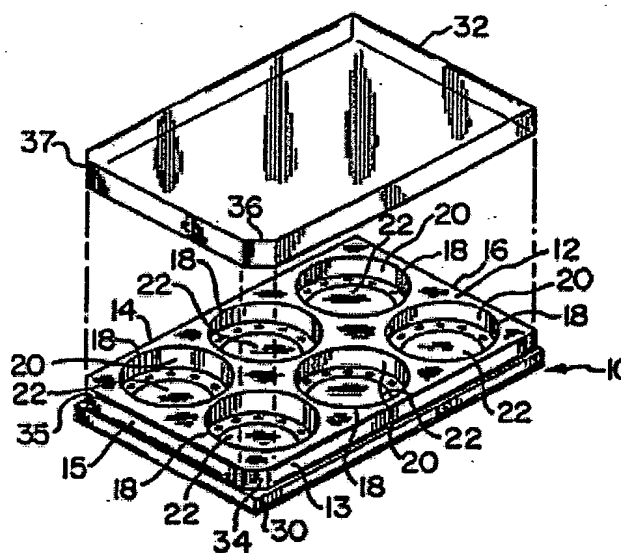
 US3350349
 US3867549
 US4273834
 US4695547
 US4705810
 more >>

Report a data error he

Abstract not available for WO8808789

Abstract of correspondent: **US4789601**

A polyorganosiloxane composition having a biocompatible surface thereon is disclosed. The biocompatible surface results from the derivatization, or amination, of the surface intended for cell contact. More specifically, the present invention is a polyorganosiloxane composition in which the surface is either treated with a primary amine and optional peptide or the surface is co-cured with a primary amine-containing silane or siloxane. The aminated polyorganosiloxane has utility as a cell culture substrate or in a variety of artificial organ applications such as breast implants, synthetic blood vessels, joints, tendons and heart valves. A vacuum apparatus for use with specialized cell culture plates incorporating the biocompatible polyorganosiloxane composition is also disclosed.



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑫ 公表特許公報 (A)

平2-501529

⑬ 公表 平成2年(1990)5月31日

⑭ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	審査請求有 予備審査請求有	部門(区分)
C 12 M 3/00 A 61 L 27/00 C 08 G 77/38 C 08 L 83/04 C 12 N 5/06	Z Y NUF LRM	8717-4B 6971-4C 6609-4J 6609-4J		1 (1)
		8515-4B C 12 N 5/00	E	(全 11 頁)

⑮ 発明の名称 細胞培養装置用の生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物

⑯ 特 願 昭63-504180

⑰ 翻訳文提出日 平1(1989)11月2日

⑱ 出 願 昭63(1988)5月3日

⑲ 国際出願 PCT/US88/01459

⑳ 国際公開番号 WO88/08789

㉑ 国際公開日 昭63(1988)11月17日

優先権主張 ㉒ 1987年5月4日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 046,440

㉕ 発 明 者 ベインズ, アルバート ジェ 米国 ノースカロライナ州 27712 ダーハム ビビングス ロード
ー.

㉖ 出 願 人 ベインズ, アルバート ジェ 米国 ノースカロライナ州 27712 ダーハム ビビングス ロード
ー.

㉗ 代 理 人 弁理士 鈴木 俊一郎

㉘ 指 定 国 A T (広域特許), A U, B E (広域特許), C H (広域特許), D E, D E (広域特許), D K, F R (広域特許), G B
(広域特許), H U, I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), N O, S E (広域特許)

請求の範囲

1. アミン、カルボン酸、あるいは元素炭素からなる群から選ばれた物質を表面に取り込んだポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする生体適合性樹脂。
2. 前記物質がアミンであり、該アミンが1級アミンであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体適合性樹脂。
3. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が表面にペプチドを取り込んでいることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体適合性樹脂。
4. 前記ペプチドがカルボキシル基終端ペプチドを含有するとを特徴とする請求の範囲第3項に記載の生体適合性樹脂。
5. 前記カルボキシル基終端ペプチドがアミン官能性を持つことを特徴とする請求の範囲第4項に記載の生体適合性樹脂。
6. 前記カルボキシル基終端ペプチドがそのアミン官能性により前記ポリオルガノシロキサンの表面に取り込まれていることを特徴とする請求の範囲第5項に記載の生体適合性樹脂。
7. 前記ポリオルガノシロキサン組成物がダウコーニングHDX4-4210 クリーングレードエラストマー、メディカルグレードシリコーン油、および触媒の混合物の硬化したものを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体適合性樹脂。
8. 1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シロキサンからなる群から選ばれた組成物を表面でコ-キユアーしたポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする生体適合性樹脂。

9. 前記ポリオルガノシロキサン組成物とコ-キユアーされる前記組成物が3-アミノプロピトリエトキシシラン、2-アミノエチルトリメトキシシラン、トリメチルシリル末端、3-(トリクロロシリル) 酸および1,1,1-トリクロロ-N-(トリメチルシリル) シラナミンからなる群から選ばれることを特徴とする請求の範囲第8項に記載の生体適合性樹脂。

10. a) ポリオルガノシロキサン表面を塩酸、希酸および臭化水素酸からなる群から選ばれる酸に接触させ、

- b) ポリオルガノシロキサン表面を水酸化アンモニウム、塩化アンモニウムおよび炭酸水素アンモニウムからなる群から選ばれたアミンと接触させ、次いで該アミンをデカントし、

- c) 前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄する段階を含むことを特徴とするポリオルガノシロキサン組成物の表面処理法。

11. 段階c) が、前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄し、時系列的に表面をアルデヒドおよびペプチド水溶液と接触させ、次いで水で洗浄することを特徴とする請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 段階c) が、前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄し、時系列的に前記表面をグルタルアルデヒドおよびアミンとカルボキシル基官能性を持つペプチド水溶液と接触させ、次いで水で洗浄する段階を含むことを特徴とする請求の範囲第10項に記載の方法。

13. 前記段階a) がポリオルガノシロキサン表面を0.5〜1.0 ml/mlの1N塩酸と接触させる段階を含むことを特徴とする請求の範囲第10項に記載の方法。

14. 段階b) がポリオルガノシロキサン表面を0.5～1 ml/cm²の1 M水酸化アンモニウムと接触させる段階を含むことを特徴とする請求の範囲第10項に記載の方法。

15. d) 前記ポリオルガノシロキサン組成物を培養細胞を支持する固体手段中に組込み、細胞培養基質を形成する段階を含むことを特徴とする請求の範囲第10項に記載の方法。

16. 請求の範囲第10～15項に記載の方法によって作られることを特徴とする製品。

17. ポリオルガノシロキサン組成物を1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シロキサンからなる群から選ばれた化合物からなる近接層とコ-キュアーすることを含むポリオルガノシロキサン組成物の表面処理方法。

18. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が3-アミノプロピルトリエトキシシラン、2-アミノエチルトリメトキシシラン、トリメチルシリル燐酸、3-(トリクロロシリル) 燐酸、および1,1,1-トリクロロ-N-(トリメチルシリル) シラナミンからなる群から選ばれ、かつ水溶液あるいは緩衝キャリアー水溶液中に懸濁された化合物と、前記近接した組成物を室温で約24時間維持することにより、コ-キュアーすることを特徴とする請求の範囲第17項に記載の方法。

19. 約60℃で大気圧下に約15分間で硬化することを特徴とする請求の範囲第17項に記載の方法。

20. 請求の範囲第17～19項の何れかの方法で作られたことを特徴とする製品。

載の細胞培養基質。

29. 前記ポリオルガノシロキサン組成物とコ-キュアーされる組成物が3-アミノプロピルトリエトキシシラン、2-アミノエチルトリメトキシシラン、トリメチルシリル燐酸、3-(トリクロロシリル) 燐酸および1,1,1-トリクロロ-N-(トリメチルシリル) シラナミンからなる群から選ばれることを特徴とする請求の範囲第28項に記載の細胞培養基質。

30. ポリオルガノシロキサン組成物を含む少なくとも一表面を持ち、細胞培養を支持する固体手段を含み、前記ポリオルガノシロキサン組成物の表面を

a) 燐酸、希酸、臭化水素酸からなる群から選ばれた酸と接触させ、酸を傾流し、

b) 水酸化アンモニウム、塩化アンモニウムおよび炭酸水素アンモニウムからなる群から選ばれるアミンと接触させ、デカントし、

c) 水で洗浄することを特徴とする細胞培養基質。

31. 段階c) が、前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄し、時系列的に前記表面をアルデヒドならびにペプチド水溶液と接触させ、前記表面を水で洗浄する段階を含むことを特徴とする請求の範囲第30項に記載の細胞培養基質。

32. 段階c) が前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄し、時系列的に前記表面をグルタルアルデヒドおよびアミンとカルボキシル基の両官能性を持つペプチドの水溶液と接触させ、前記表面を水で洗浄する段階を含むことを特徴とする請求の範囲第30項に記載の細胞培養基質。

21. 培養細胞を支持する固体手段を含み、該固体手段が、アミン、カルボン酸あるいは元素炭素からなる群から選ばれる物質を表面に取り込んだポリオルガノシロキサン組成物を含む少なくとも一表面を持つことを特徴とする細胞培養基質。

22. 前記物質がアミンであり、該アミンが1級アミンであることを特徴とする請求の範囲第21項に記載の細胞培養基質。

23. 前記ポリオルガノシロキサン組成物がその表面にペプチドを取り込んでいることを特徴とする請求の範囲第21項に記載の細胞培養基質。

24. 前記ペプチドがカルボキシル基末端ペプチドを含むことを特徴とする請求の範囲第23項に記載の細胞培養基質。

25. 前記カルボキシル基末端ペプチドがアミン官能性を有することを特徴とする請求の範囲第24項に記載の細胞培養基質。

26. 前記カルボキシル基末端ペプチドが前記ポリオルガノシロキサンの表面にそのアミン官能性により取り込まれていることを特徴とする請求の範囲第21項に記載の細胞培養基質。

27. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が、ダウコーニングMX4-4210 クリーングレードエラストマー、メディカルグレードシリコーン油および触媒の混合物の硬化したものを含むことを特徴とする請求の範囲第21項に記載の細胞培養基質。

28. 前記ポリオルガノシロキサン組成物がその表面を1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シロキサンからなる群から選ばれた組成物とコ-キュアーされることを特徴とする請求の範囲第21項に記

33. 段階a) が、ポリオルガノシロキサン表面を0.5～1 ml/cm²の1 N塩酸と接触させる段階を含むことを特徴とする請求の範囲第30項に記載の細胞培養基質。

34. 段階b) が、ポリオルガノシロキサン表面を0.5～1 ml/cm²の1 M水酸化アンモニウム水溶液と接触させる段階を含むことを特徴とする請求の範囲第30項に記載の細胞培養基質。

35. 前記ポリオルガノシロキサン組成物を細胞培養を支持する固体手段上に組入れる段階を含むことを特徴とする請求の範囲第30項に記載の細胞培養基質。

36. 細胞培養を支持する固体手段を含み、該固体手段がポリオルガノシロキサンを含む表面を少なくとも一つ有し、該ポリオルガノシロキサン組成物が1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シロキサンからなる群から選ばれる化合物を含有する近接層とともに硬化することにより処理された表面を持つことを特徴とする細胞培養基質。

37. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が3-アミノプロピルトリエトキシシラン、2-アミノエチルトリメトキシシラン、トリメチルシリル燐酸、3-(トリクロロシリル) 燐酸、および1,1,1-トリクロロ-N-(トリメチルシリル) シラナミンから選ばれる化合物を懸濁した水溶液あるいは緩衝キャリアー水溶液の近接層とコ-キュアーされ、このコ-キュアーは近接組成物を室温で、実質的に光なしで、約24時間維持することにより行うことを特徴とする請求の範囲第36項に記載の細胞培養基質。

38. 前記とともに硬化する処理を60℃、大気圧下で約45分間行う

ことを特徴とする請求の範囲第36項に記載の細胞培養基質。

39. 前記固体手段がマルチウェルポリスチレンプレートであることを特徴とする請求の範囲第21項、第30項あるいは第36項に記載の細胞培養基質。

40. 前記ウェルの各々がその底部に前記ポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする請求の範囲第39項に記載の細胞培養基質。

41. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部と覆層物を形成することを特徴とする請求の範囲第40項に記載の細胞培養基質。

42. 前記ウェルの各々の実質的に全ウェル底部が前記ポリオルガノシロキサン組成物の単一層を含むことを特徴とする請求の範囲第40項に記載の細胞培養基質。

43. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部に有るアンカーリングに接着していることを特徴とする請求の範囲第42項に記載の細胞培養基質。

44. 一つ以上のウェルを有する細胞培養プレートを含み、前記ウェルの各々が少なくとも部分的にエラストマー状態で形成された実質的に平らな底部を有し、前記エラストマー状態が細胞培養と細胞付着を許す、処理された上面を持っていることを特徴とする細胞培養基質。

45. 一つ以上のウェルを有する少なくとも一つの細胞培養プレートを含み、前記ウェルが各々生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物で作られるエラストマー状態で少なくとも部分的に形成される実

質的に平らな底部を有し、前記エラストマー状態に真空の引張り力を制御的に加える真空手段を含むことを特徴とする細胞培養に応力を加える装置。

46. 前記真空手段が、制御手段により真空源に接続される真空プレナムを含み、前記培養プレートが前記真空プレナムにより保持され、かつ該真空プレナムと接触し、前記真空プレナムが前記真空を前記エラストマー状態の底面に連絡する手段を含むことを特徴とする請求の範囲第45項に記載の装置。

47. 前記真空プレナムが少なくとも一つの真空溝をその上表面に有する平らな板であり、前記プレナムの上表面に隣接し、前記培養プレートの下部に位置する実質的に平らなガスケットを含み、前記ガスケットが貫通した1つ以上のアパチャーを有し、該アパチャーが下部に有る真空溝と上部に有る培養プレートのエラストマー状態と一致して配列されかつ両者の間に伸びており、シールされたエアチェンバーが形成され、該エアチェンバーはエラストマー状態から、アパチャーと真空溝等を經由して前記真空源に至ることを特徴とする請求の範囲第46項に記載の装置。

48. 前記プレナムと前記真空源の間に配置された流通手段を含み、真空の前記真空プレナムへの適用を制御する制御手段を含むことを特徴とする請求の範囲第47項に記載の装置。

49. 前記流通手段がソレノイドバルブであり、前記制御手段が前記ソレノイドバルブに電気的に接続されるコンピュータであることを特徴とする請求の範囲第48項に記載の装置。

図 表 明

細胞培養装置用の生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物

技 術 分 野

本発明は、試験管内及び生体内で、改良された生体適合性を示す表面改質ポリオルガノシロキサン組成物およびこのような組成物を取り入れた細胞培養装置に関する。

従 来 技 術

合成高分子は技術及び日常生活で広く使用されているが、臨床医学及び実験医学では高分子は慎重に扱われ、その使用は限定されていた。

この制限使用は需要と関係がなく、人工臓官及び血液透析あるいは酸素添加用膜製造用、血膜あるいは血液の置換物製造用及び薬剤、ホルモンあるいは他の生理的に活性な物質の除放用の基質としての体内埋込み用あるいは可溶性高分子の製造用に適当な合成高分子の需要が増大している。

不幸にして、種々のシリコン樹脂のように比較的低い細胞毒性を示す合成高分子でも、一般には少なくともある程度の生体不適合性を示す。たとえば、哺乳動物あるいは人の組織に埋込んだシリコン樹脂インプラントは、通常、上皮性カプセル化、あるいは上皮肥厚および/または周囲の関連組織の角化によるカプセル化などを生じる。試験管内での類似の現象は、合成高分子基質に引張りあるいは他の歪を生じさせる力を加えると細胞が多くのこれら基質に

付着するのを妨げる。

特に、試験管内細胞培養に関して、試験管内で細胞が付着できるエラストマー基質に対する需要が大きいのは、生体内応用で生体適合性高分子に対する需要の場合と同様である。この需要は細胞培養の試験管内曲げの分野の開発から生じた。この曲げ技術は従来法の細胞培養法と比較していくつかの利点を示す。

試験管内での細胞培養に用いる従来法の培養プレートあるいは培養瓶は、一般にポリスチレンあるいはガラスで作られている。細胞を培養する通常法としては、細胞をフラスコ、単一培養皿、あるいはマルチウェルプレートに接種し、栄養基質を加え、制御条件下で細胞を培養する方法が挙げられる。試験管内で細胞を培養する別の方法には、連続して回転するガラスあるいはプラスチックの瓶中で細胞を培養し、絶えず回転する媒質の下で培養容器壁に細胞を付着させる（代りに、細胞を内表面積の大きな滑りローラー瓶中で培養することもできる）方法、あるいは細胞をガラス上、複雑な多層膜ビーズ、組織セグメント上で培養する方法、あるいは細胞を適当な細胞媒質中に懸濁させて培養する方法などがある。しかし、これらの方法にあつては、培養媒質が細胞自身に実効応力、たとえば腫瘍によって加えられる体内での応力、あるいは心臓や肺がその構成細胞に加える周期的な応力などと類似するような変位応力を及ぼすようなことはない。

肺の環境中で物理的変形中に、細胞が経験することをシミュレーションするために、細胞をエラストマーからなる基質に付着させ、基質には周期的に1分間で15回20%の伸びを加え、休息状態を

シュミレーションしながら培養することができる。肺細胞に周期的に1分間で40回20%の伸びを加え、運動中の状態をシュミレーションすることもできる。このような研究は、細胞がビールス性感染を受け易いのは、周期的に変形応力を加えられたときか、あるいは静止したときかあるいはマクロファージに周期的に変形が加えられる場合、バクテリアをしっと容易に食菌するかどうかといった疑問、あるいは関連した問題向けに適合させることができる。これらの問題に対して得られた解答は、次にビールス性あるいはバクテリア性感染を受けている患者の治療計画の開発に際し考慮に入れることができる。

培養中の細胞の試験管内曲げの一システムが、エイ・ジェイ・ベインズらにより、“試験管内細胞に静的あるいは可変周期的強力あるいは圧縮力を加える新しい真空操作応力供与装置”という表題でジャーナル オブ セル サイエンス (J. Cell Sci., 1985) に報告されている。然し、この公表された用法中では、プラスチック(ポリスチレン)のペトリ皿の物理的制限は、細胞基質(ペトリ皿底部)における周期的変形の制限量以上に押えられた。(関連した試験管内システムは、ディー・ソムジェンらにより“媒介されたプロスタグランジンE₂ 中での物理応力により誘起された骨の再構成”という表題でビオヒミカス ビオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta., 627(1980)91-100) に、ディー・ワイ・エム・ルングらにより、エクスペリメンタル セル リサーチ (109(1977)285-298) に発表された“機械的刺激に対する細胞応答の研究に用いられる新規試験管内システム”、ディー・ワイ・エム・ルングらによ

り、サイエンス (191(1976)475-477) に発表された“周期的引張り試験管内での動脈平滑筋細胞による高質成分の合成を刺激する”、ハセガワらにより、カルセフ ティッシュ インターナショナル (Calcif Tissue Int., 37(1985)431-438) に発表された“機械的引張りはデオキシリボ核酸を合成する培養骨細胞の数を増やし、蛋白合成のパターンを変える”、ディー・エム・ブルーネットらにより、ジャーナル オブ セル サイエンス (J. Cell Sci., 69(1984)35-45) に発表された“機械的引張りはデオキシリボ核酸を合成する培養中の上皮性細胞の数を増やす”などに大々報告されている。上記のすべてを考慮すると、生体内でのカプセル化を促進せず、試験管内での細胞の付着を妨げない低細胞毒性合成高分子組成物に対する需要は依然として存在する。理想的には、このような組成物は一般に低細胞毒性と高い引張強度およびたわみ強度を示すことで知られているシリコン樹脂組成物の色々な利点をも提供するであろう。

発明の開示

本発明は、この需要に応じるための生体適合性表面を有するポリオルガノシロキサン組成物に関する。生体適合性表面は細胞接触を意図した表面の改質によって得られる。より詳細には、本発明はポリオルガノシロキサン組成物に関し、その表面に炭素粒子が埋込めであるか、その表面を1級アミンおよび付加的な選択によりペプチドで処理してあるか、あるいはその表面を1級アミン含有あるいはカルボキシル基含有のシランあるいはシロキサンとともに硬化してある。改質したポリオルガノシロキサンは細胞培養基質、あるいは

胸部インプラント、人工血管、人工関節、人工腱、人工心臓弁等の多くの人工臓器の応用に有用である。本発明では、生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物を取入れた特別な細胞培養プレートと使用する真空装置も開示されている。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物を有する6ウェル培養プレートとそのカバーの分解斜視図、第2図は第1図に示した培養プレートの平面図、第3図は第2図のII-IIの線に沿って切断して得られた断面図、第4図は第1図に示した培養プレートとの関連で使用するために適した真空装置の分解斜視図、第5図は第4図の真空装置の斜視図、第6図は第5図のVI-VIの線に沿って切断して得られた断面図、第7図は第3図の真空装置を制御する装置の略略図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のポリオルガノシロキサン組成物の表面改質は3方法の中の1つ以上の方法により達成される。組成物表面に炭素粒子を埋込まれていても良く、また同表面を1級アミンとオキシゲンによるペプチドで処理されていても、あるいは同表面を1級アミン含有あるいはカルボキシル基含有のシランあるいはシロキサンとともに硬化されていても良い。現在、アミノ基あるいはカルボキシル基および場合によっては、ペプチドはポリオルガノシロキサン組成物の表面に集まり、生体適合性表面を形成すると信じられている。改質反応は硬化してないかあるいは硬化したポリオルガノシロキサン表面上で行なう。しかしながら、何れの場合でも、改質はポリオルガノシロ

キサンの表面上で行なう。

硬化したあるいは硬化してないたとえ膜のようなポリオルガノシロキサン表面の改質の第1の方法は、表面に複数の炭素粒子を埋込む方法が含まれる。たとえば、キュアしてない表面をベンゼンバーナーの焰上に吊し、微細な炭素粒子を表面に析出させ、表面を硬化する。得られた表面は改善された生体適合性を示す。

硬化したポリオルガノシロキサン膜をアミノ化する第2の方法は、2つの基礎段階を含む。最初に、膜表面を大気中において、0.5~1 ml の1N HCl で30分間浸漬し運動をさせながら処理する。次に酸をデカントする。その後大気中において、表面を0.5~1 ml の1M NH₄OH と30分間浸漬させる。別の方法としては、酸をデカントした後、ベルジャー中で表面をアンモニア蒸気に15分間さらす。得られた改質表面を水洗し、乾かす。代りに化学量論的に当量のHF、HBr (あるいは他のハライド含有酸)、NH₄Cl あるいはNH₄HCO₃ のような他の酸や1級アミンを使用しても良い。このように処理した表面ではポリオルガノシロキサンはアミノ基が関基となり、高分子表面に配向しているので生体適合性を示すと信じられている。

ポリオルガノシロキサン表面を処理する第3の方法は、上記のアミノ化処理と次いでオキシゲンで行なうペプチド化が含まれる。酸性化し、アミノ化する段階の後で水洗し、表面を0.5~1 ml/ml の1ナノモル〜1ミリモルのグルタルアルデヒドと接触させて処理する。当量の反応性のある他のアルデヒド、たとえばアセトアルデヒドあるいはブチルアルデヒドなどを代りに使っても良い。グルタ

ルアルデヒド処理表面を、次に一般にアミンとカルボキシル基の官能性を持つペプチドの水溶液と接触させる。通常は、選択したペプチドは直鎖上に2~40のアミノ酸を持ち、相対する末端でアミンとカルボキシル基の官能性を持つようにする。しかし、分子数数千のより大きなペプチドや蛋白を用いることもできる。最後に水洗する。アルデヒドは結合アミンと反応して Schiff 塩基を生じ、残った遊離のアルデヒドはペプチドのアミノ基と反応する。生じたアミノ化/ペプチド化ポリオルガノシロキサンは従って生体適合性の1級アミンを含有するカルボキシル基を末端とした表面を形成する。この表面の生体適合性は、特定の細胞培養との組織適合性によってペプチドを選べば、殊に高められる。特定の応用に対しては、公知の手段によりペプチドの生体適合性が決定できる。

アミノ化の第4の方法としては、ポリオルガノシロキサンを1級アミン含有あるいはカルボキシル基含有シランあるいはシロキサンとコ-キュアする方法を挙げられる(コ-キュアするとは、少なくとも1つの隣接したシランあるいはシロキサン含有組成物がその場所で硬化することを意味する)。典型的化合物としては、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、2-アミノエチルトリメトキシシラン、トリメチルシリル硫酸、3-(トリクロロシリル)硫酸および1,1,1-トリクロロ-1-(トリメチルシリル)シランアミンなどが挙げられる。1級アミン含有またはカルボキシル基含有のシラン、あるいはシロキサンの適当な希釈剤としては、メトキシトリメチルシラン、トリメトキシシラン、クロロジメチルシランおよびクロロトリイソシアナートシランなどを挙げることができる。シランある

いはシロキサン(シラン希釈剤を含む場合と含まない場合がある)を實質的に中性あるいは塩基性水溶液あるいは緩衝水溶液で用い、硬化したポリオルガノシロキサン表面全体を覆う。たとえばこの分野では良く知られている20mM HEPES緩衝液のように、細胞培養媒質を作成するのに通常用いる緩衝液はどれでも、シランやシロキサンの溶液あるいは担体として使用するのに適している。生じた層は室温で15分以上、24時間以下の間コ-キュアする。

望ましい場合には、硬化は高い温度で行う。代りに、1級アミン含有あるいはカルボキシル基含有のシランあるいはシロキサンを硬化していないポリオルガノシロキサン上に塗布し、二層をコ-キュアしても良いが、その方法は高価となるポリオルガノシロキサン層のみを硬化する場合と同様である。硬化した表面はさらに、上に述べたように所望に応じてペプチド化するか、あるいは炭素粒子埋込み処理を行うことができる。

上記の何れかの方法で調製した後、組成物は水あるいは緩衝液で洗浄し、紫外線等で殺菌し、使用時の貯蔵のため包装する。他の殺菌法としては、公知のマイクロウェーブエネルギー、ガンマ線放射および他の公知の殺菌手段などを挙げることができる。

特定の改質法については、下記の実施例で詳細に述べる。

上記の方法で改質した生体適合性ポリオルガノシロキサンは多くの潜在的応用が有るが、このようなエラストマーの殊に重要な使用法の一つには細胞培養高質の試験管内での曲げがある。細胞培養高質としてさえも、本発明の改質ポリオルガノシロキサンの使用法は無数に有る。色々な細胞培養容器と組合せて、組成物単独でも使

用できるし、付着細胞培養増殖が望まれる他の応用にも使用できる。

本発明の生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物を利用した細胞培養プレート10の1具体例を第1~3図に示す。培養プレート10は實質的に平らで、矩形状の構造をしていて、平らな上面12と、この上面12の外周端部から下側に伸び、かつ隣り合った端で接合している側壁13、14および終端壁15、16とを有する。上方が開放された複数のウェル18は上面12から下方に伸びている。第1~3図に示す培養プレート10は、2×3配列となった6個のウェル18を有するが、必要に応じて、ウェル18は幾つであっても良く、1つでも良い。

各ウェル18は円筒形の側壁20を有し、側壁20に取付けた實質的に平らなウェル底部22で終る。ウェル底部22は側壁20と一体になったアンカーリング24を含む。ウェル底部22の残りは、エラストマー状膜26により形成され、エラストマー状膜26はアンカーリング24を覆い、かつアンカーリング24によって面成される開口部を満たす。アンカーリング24は、好ましくはフラストコニカル(鉄頭円錐)状に形成され、かつこのアンカーリング24を貫通した複数の孔28を有する。孔28はエラストマー物質で満たされていて、この物質はエラストマー膜26と連続する。この構造はウェル底部22に於て、膜26をその場所で確保するのに役立つ。膜26は、上記のように、表面改質ポリオルガノシロキサン組成物で作られる。

ウェル18は側壁13、14および終端壁15、16の下端より僅かに下方に出ている。培養プレート10は保護底部リム30を有

し、これは側壁13、14および終端壁15、16の下端から下方に伸び、ウェル底部22の底面より下にある。底部リム30はウェル底部22を持ち上げ、ウェル底部22にかき傷がついたり、底部22が損傷を受けたりするのを防ぐ。

培養プレートの上面12、すなわち複数のウェル18は、カバー32あるいは類似の物で閉じられる。四角有った終端壁と側壁の間の隔は、培養プレートの確実な方向付けができるように構成しても良い。第1~2図に示すように、側壁13と終端壁15の間の隔34および側壁14および終端壁15の間の隔35は面取りしてある。カバー32にも矢張り対応して面取りした隔36、37が有る。底部リム30の外表面に溝加工し、培養プレート10をより安全に取除くようにできる。

第1~3図に示す培養プレート10は、1.5mm厚ポリスチレンで作った市販のファルコン6ウェル培養プレートを用いて作成できる。ファルコン培養プレートは實質的に平らなポリスチレンの固体層で作ったウェル底部を有する。ファルコン培養プレートのウェル底部は部分的に削除して、各ウェル18にポリスチレンの底部アンカーリング24を残すことができる。各アンカーリング24にドリルで複数のフラストコニカル孔28を明け、孔の狭い方の端がアンカーリング24の上面にくるようにする。公知の手段で適当な離型層をアンカーリング24の底下に取付け、硬化していないポリオルガノシロキサン組成物を各ウェル18内に置く。適当なポリオルガノシロキサン組成物の一例としては、ダウコーニングHDX4-4210(商品名 SILASTIC で販売)が挙げられる。代表的な組成物例は、

グーコーニングHDX4-4210 35部、適合するロット番号の脱気15部およびメディカルグレードのシリコン油15部である。このようなあるいは類似の混合物から得られる硬化していないポリオルガノシロキサンの予定量を各ウェル18に注ぎ、ウェル底部に膜を形成し、同時にこの硬化していない組成物はアンカーリング24中のプラストフニカルホール28の各々に流れ込む。ポリオルガノシロキサンは次いで脱気し、硬化し、脱気層を除いて、第1〜3図の培養プレート10を作成する。

硬化していないポリオルガノシロキサンの脱気（あるいは気泡除去）は特に光学的に透明なウェル底部22の作成の際に重要である。（たとえば、光学的に透明であると、細胞培養を保持するエラストマーの顕微鏡検査が容易になる。）気泡は公知の手段で除くか、あるいは特別な遠心分離技術によって明確に除去できる。遠心分離で脱気するために、個々の培養プレート10はカバー32を付けた状態あるいはカバー32なしで、培養プレート10を取替えるようになっている遠心分離器中に置く。プレートには次に重力の800〜1200倍の遠心力を3〜6分間かける。プレート10を遠心分離器から取り出し、手あるいは機械で回転あるいはゆすり、ポリオルガノシロキサンウェル底部22ができるだけ平らな膜になるようにする。プレートをオープン中、約60℃で45分間硬化させ、オープンから取出し、冷却する際に脱気層を剥離し、培養プレート10のウェル底部22の上面を上記の何れかの方法で、また、下記の実施例で詳細に述べるように改質できる。

一般に、本発明の培養プレート10はウェル底部22を有し、こ

れは細胞が付着できる基質を与える外に、多くの手段で延伸し、あるいは応力を加えることができる。ウェル底部22のようなエラストマー細胞基質を延伸するのに特に便利の一つの方法は、選択的にウェル底部22の直下の閉領域を制御真空源に接続する方法がある。このような真空延伸は、各ウェル底部22の下に取付けてある個々の真空孔を用いて行なう。各ウェル底部22を選択的に真空にするより簡単に効果的な装置を第4〜6図の真空装置により示す。

第4〜6図に示す真空装置は、ブレイクシグラス（商品名）あるいは類似品の固体で、平らで、矩形の板で作った真空プレナム40を有する。プレナム40の上面には、複数の真空溝が切削加工してあり、この溝の深さはプレナム40の厚さより少ない。主真空溝42はプレナム40の板厚の半分以上の深さがあり、実質的にプレナム40の全長に亘っている。複数の副真空溝44は、主真空溝42の各側から直角に伸び、主真空溝42と流体が流通するように連絡している。プレナム40の一端にドリルで孔を明け、この孔には主真空溝42と流体で連絡するニップル46が取付けられている。ニップル46は真空ホース48とつながり、真空ホース48はプレナム40を真空源（図示しない）と接続する。

各真空溝42、44はその全長のどの点に於いてもプレナム40の上面に開口している。開口し表面にある真空溝42、44を孤立させるため、平らなゴムラバーガスケット50をプレナム40の上面に隣接して置く。ガスケット50は矩形で、プレナム40と同寸法である。ガスケット50は複数の開口部あるいはアパチャー（aperture）52を有し、この開口部は下部の副真空溝44と流体

が流通するように連絡する。主真空溝42はガスケット50により完全に覆われる。アパチャー52は、培養プレート10をガスケット50の上面に置いた時、各々が一つのウェル18の底部22の直下に配列して、位置するように置く。従って、アパチャー52は、真空溝42、44からのみ作用し得る個々のシールされた空気チェンバーを作り出す。第4〜6図に示す実施例では、ガスケット50は6つの群（各群は2×3配列）のアパチャー52を有する。3群のアパチャーの各群は分離した副真空溝44の上に位置している。従って、第4〜6図に示す真空装置は、上記したような、第1〜3図に示す培養プレート10を6つ収容する。第4〜6図に示す真空装置は、6つの個々のウェル培養プレートを使用するように設計してあるが、色々な数のウェルを有する個々のプレートが幾つあっても、使用する特定のプレート（単数あるいは複数）が必要とする位置に真空溝42、44およびアパチャー50を設けるのみで使用できる。

真空ホース48を通じて生じた真空は、同様に、真空溝42、44を経由して、培養プレート10のウェル底部22の下にあるアパチャー52により形成される各チェンバー中に生じる。真空が生じると、各ウェル18中のエラストマー膜26は下部に引張られ、伸びて屈曲した立体配置に到達し始める。第6図は、充分な真空度が得られた時に、エラストマー膜26の下方への伸びを示す。真空度を減じると、膜26は第3図に示す元の水平配置に戻る。膜26の真空中での延伸は、一定状態で留めておくか、周期的に行うか、不規則に行なうか、あるいは望ましいパターンで行う。しかし、6

つの培養プレート10の各々は同一の真空状態に置かれる。

第4〜5図に示す真空装置は広範な各種のシステムにより、制御した仕方で真空に引かれる。このようなシステムの1つを第7図に図式的に示す。プレナム40（図示していない）、ガスケット50および培養プレート10を含む各真空装置はホース48を経由して、ソレノイドバルブ54に接続する。ソレノイドバルブ54は、夫々ホース56を経由して、複数の出口を持つ真空源58に接続する。ソレノイドバルブ54は、それぞれ配線60を経由して、コンピューター62あるいは他の制御装置に接続される。各ソレノイドバルブ54は、各培養プレート10のウェル底部22中のエラストマー膜26を真空に引くのを制御する。コンピューター62はソレノイドバルブ54の操作を制御し、真空に引く時期と強度を制御するのみでなく、真空プレナム40中の溝42、44を平衡化し、望ましいだけ雰囲気中の空気を戻す。単一あるいは複数のソレノイドバルブ54を使って真空に引いたり、大気圧に戻したりする。さらに、各圧力—電気信号変換器を各真空プレナムと結合し、あるいは各エラストマー膜26の下に置き、その出力信号をコンピューター62に供給することもできる。圧力—電気信号変換器によって生じた情報は実際に真空に引くのを制御するのに使用できる。

ウェル底部22に付着している細胞はウェル底部22自身に加えられる応力に釣り合った応力を受ける。このシステムは、従って、上で論じたように細胞培養基質の試験管内曲げに使うことができる。6つの培養プレート10と関連した真空装置はもちろん、標準の培養器中で培養できるし、あるいは公知のマルチウェル培養プレート

のように培養条件にさらすことができる。

細胞の曲げを必要としないが、細胞基質への細胞の接着が望まれている特定の応用については、本発明の表面改質したポリオルガノシロキサン組成物を、最初にウェル底部を切削することなしに、6ウェル培養プレート中に付着させても良い。この付着させた表面改質ポリオルガノシロキサン層はどんな厚さでも良いが、通常は1mm厚程度の膜であることが必要すべてである。

本発明の性質を変更することなく、本発明の開示に応じて種々の変更を加えることができる。底部アンカーリングを使って作成した6ウェルの培養プレートは底部アンカーリング孔28を持つ必要がない。たとえば、硬化していないポリオルガノシロキサンを置く前に、底部アンカーリングを粗面化し、シロキサン樹脂の実際の底部アンカーリング表面への接着性を高めても良い。表面改質したポリオルガノシロキサンは、同様に、複数の細胞培養容器にも細胞培養基質として組み入れることができ、何れにしてもマルチウェルプレートには限定されない。本発明のポリオルガノシロキサン組成物は、培養容器隔壁と同様に、細胞が付着できる個々の分離した粒子あるいはビーズとして用いるか、あるいは当該技術の専門家には直ちに明らかな多くの他の方法の一つに使用できる。真空装置を使えば、上記のようにして作成されたポリオルガノシロキサン膜中に真空伸びが誘起できる。作成した膜あるいは膜の厚みを公知の手段で研削し、予言可能な伸び特性を持つ基質を形成することができる。

本発明の表面改質したポリオルガノシロキサン組成物は、上皮性のカプセル化あるいは周囲の結合性組織の厚み増大、および/ある

いはセラチン化を促進しないので、事実上細胞付着が望ましいインプラントあるいは人工器官は本発明のポリオルガノシロキサン組成物から製造できる。表面改質ポリオルガノシロキサンの可能な使用法(限定されるものではない)として、合成血管、胸部、インプラントを含む精密的人工器官および人工ひざや人工関節のような人工関節が含まれる。たとえば、人工関節はポリオルガノシロキサンから作られ、ポリオルガノシロキサンは指関節構造の端末で選択的にアミノ化され、その結果、細胞が指関節の端部に付着できる。付着した細胞は骨中に定着するが、滑りが起る必要のある指関節中央部には付着しない。このようにして選択的に改質したポリオルガノシロキサンは、細胞の付着と非付着が選択的に制御できるので、インプラントとして使用するのに殊に適している。

[実施例]

以下の実施例により本発明について詳細に述べる。

実施例1

5×3/16-5×5/16インチファルコン6ウェルポリスチレン培養プレートを木製治具保持体中に固定した。各ウェルの底部の中心点にマークを入れた。1-1/16インチの金属ドリルバイトを中心マークの直上に置き、ドリルバイトを使ってプラスチックに略完全に穴をあける。穴が規定寸法を超えないように、完全なドリル穴開けは避けた。ウェルの中心部は指の圧力で押し出して、ウェルの底部に4mm巾のアンカーリムを残した。

プレートを治具中に逆さにして確保した。研削バイトで、ウェルの残りのポリスチレン底部に12の等間隔のフラストコニカル状の

孔をあけた。再び治具中で板を逆さにし、石のバイトを使い、ウェルの底部に残るポリスチレンリングと隔壁を粗面化した。その後でプラスチック粒子を真空吸引により除いた。

培養プレート全体を95%エタノールで洗浄して取扱いにより入りこんだ汚染物を除去した後、プレートを洗浄表面上で逆さにして、ウェル底部を3インチ巾の粘着テープでシールした。粘着テープは注意深く当てがい、各培養プレートウェルに滑らかで平らな底面を生じるようにした。プレートを直立させた。

85gのダウコーニングHDX4-4210 クリーングレードのエラストマーと、15gの触媒および15gのメディカルグレードのシリコンオイルとを混合して、ポリオルガノシロキサン組成物を調製した。混合成分は、プラスチックの使い捨て式ビーカーに量り出し、ドリル装置の塗料混合バイトを使って混合した。得られた混合物を2つの60mlプラスチック注射器に満たし、残りは後の使用に備えて-20℃で貯蔵した。

作業は手早く行ない、各プレートは秤上に置き、注射器を使って各ウェルに2.0gの混合物を入れた。4プレートに入れ終わった後、このプレートを遠心分離器にかけ、重力の1000倍の力を4.5分間(室温で)加えて、樹脂中から目視で検出できる気泡をすべて除いた。手早く作業するため、樹脂は注入と遠心分離の間、見かけ上粘度を増すことはなかった。また、各培養プレートの底部にある膜は容易に充分に安定し、遠心分離器から取出すと平らな面を形成した。

硬化するため、プレートを60℃にしてあるオープン中の平らな

金属製盤上に45分間置いた。(高温での硬化が何かの理由で遅れたら、遠心分離にかけたプレートは加熱前に、-20℃で貯蔵することができる。)プレートをオープン中から取出し、平らな面上で30分間室温となるまで放置した。

純度98%の3-アミノプロピルトリエタキシラン5mlを、5mlの1M HEPESバッファー(pH 7.2)と混合し、次いで脱イオン水を加えて250mlの体積にした。得られた3-アミノプロピルトリエタキシラン溶液の3mlずつを各ウェルに加え、培養プレートをポリエチレンフィルムで覆った。プレートは室温の暗所で12時間養生した。各細胞培養ウェルの底部にあるアミノ化したポリオルガノシロキサン表面を20mM HEPESバッファーを2回使って簡単に洗浄し、次いで、最後にHEPESバッファーを加え、アミノ化した表面に15分間置いたままにした。次に、粘着テープをプレートの底部から注意深くはがして、細胞培養フード中で培養プレートに紫外線を12時間当てて殺菌し、殺菌したプレートを殺菌条件下でプラスチック包装中で密封した。

実施例2

実施例1において、作成した培養プレートは、第4〜7図に示す真空装置を取付けた状態で細胞を接種し、培養した。この装置は定期的に毎分40回の割合で各ウェル底部を20%延伸した。細胞培養が完結した後、光学的に透明な生体適合性のポリオルガノシロキサン膜は、エラストマー状基質から細胞を除去することなしに、細胞の顕微鏡検査を可能にした。エラストマー状基質は、また、サンプリングに適していることが判り、ナイフ、コルク型あけ器、冠状

のこパンチの何れでも首尾良く切断できた。これらの付着した細胞を有する切断セグメントはスライド上に乗せ、蛍光性試験で染色し、顕微鏡で検査した。

実施例3

実施例1の工程をくり返したが、その際、遠心分離の代りに、プレートは -20°C で5日間置き (incubate)、エラストマーが徐々に脱気され、樹脂が平らになるようにした。次にプレートを冷蔵庫から取り出し、実施例1に従って硬化し、アミノ化した。

実施例4

実施例1に従って、生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物のウェル底部を作成したが、その際、アミノ化は次の方法により行った。各硬化ポリオルガノシロキサンウェル底部を1mlの1N HClと接触させ、次いで1mlの1M NH_4OH を加えた。各試験は30分間加えた場所にそのままにして置き、次いでデカントした。プレートを水で洗い、乾燥し、実施例1に従って殺菌し包装した。

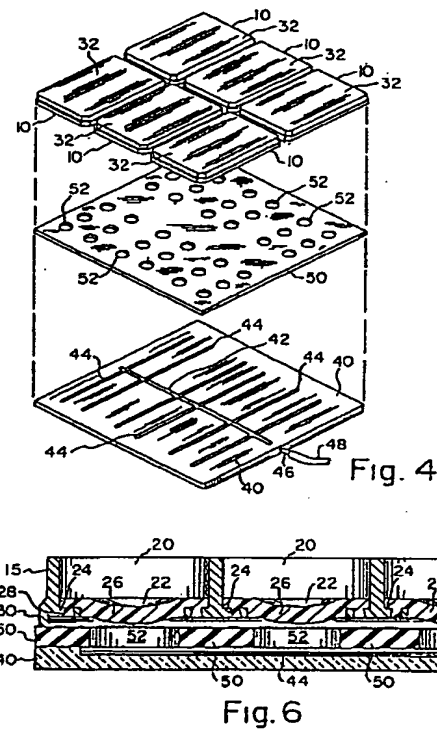
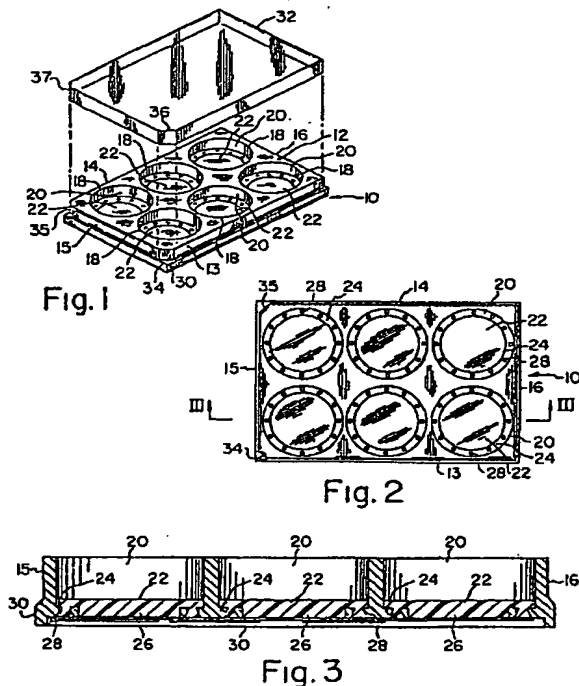
実施例5

実施例4に従って、生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物ウェル底部を作成したが、その際、 NH_4OH を添加し、水で洗浄した後、ウェル底部をグルタルアルデヒドおよびペプチドで次のように処理した。

各ウェルに1mlの1ナノモルグルタルアルデヒドを加えた。次いで、各ウェルはアミンおよびカルボキシル基官能性を持ったペプチド水溶液と接触させた。ペプチド水溶液を充分に加え、ウェル底部

表面を覆った。選んだペプチドは1mMの $\text{NH}_2\text{-RGDS-COOH}$ (R =アルギニン、 Q =グリシン、 D =アスパラギン酸、 S =セリン)の水溶液であった。30分後に、実施例1に従い、板を洗い、乾かし、殺菌し、包装した。

特定の実施態様と実施方法について、本発明を記載したが、本発明は以下に記載する特許請求の範囲によってのみ制限される可きである。



平成元年11月 2日

特許庁長官 吉田 文 殿

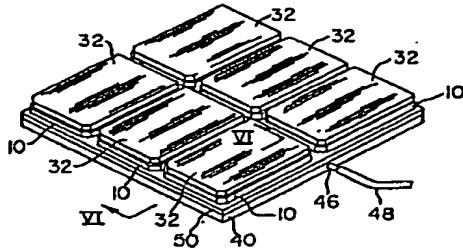


Fig. 5

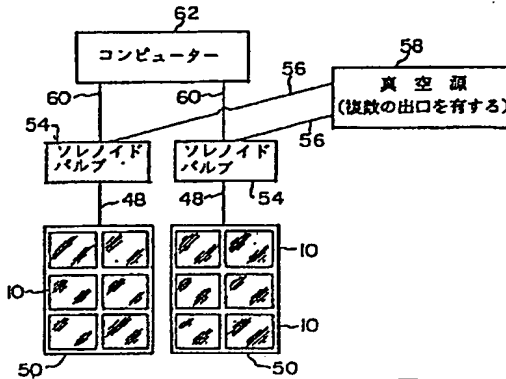


Fig. 7

特許請求の範囲を以下の通り補正する。

「特許請求の範囲」

1. アミン、カルボン酸、あるいは元素炭素からなる群から選ばれた物質を表面に取り込んだポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする生体適合性樹脂。
2. 前記物質がアミンであり、該アミンが1級アミンであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体適合性樹脂。
3. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が表面にペプチドを取り込んでいることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体適合性樹脂。
4. 1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シロキサンからなる群から選ばれた組成物を表面でコーキューアしたポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする生体適合性樹脂。
5. a) ポリオルガノシロキサン表面を塩酸、弗酸および臭化水素酸からなる群から選ばれる酸に

1. 事件の表示
PCT/US88/01,459
2. 発明の名称
細胞培養装置用の生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
氏 名 ベインズ、アルバート ジュー。
4. 代理人 (郵便番号 141)
東京都品川区西五反田二丁目19番2号
荒久ビル3階
[電話東京(491)3161]
8189 弁理士 鈴木 俊
5. 補正命令の日付
自発補正
6. 補正の対象
明細書の「特許請求の範囲」の欄。
7. 補正の内容
別紙のとおり(但し、補正の対象の欄に記載した事項以外は内容に変更なし。)

特許庁

接触させ、

b) ポリオルガノシロキサン表面を水酸化アンモニウム、塩化アンモニウムおよび炭酸水素アンモニウムからなる群から選ばれたアミンと接触させ、次いで該アミンをデカントし、

c) 前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄する段階を含むことを特徴とするポリオルガノシロキサン組成物の表面処理法。

6. 段階c)が、前記ポリオルガノシロキサン表面を水で洗浄し、時系列的に表面をアルデヒドおよびペプチド水溶液と接触させ、次いで水で洗浄することを特徴とする請求の範囲第5項に記載の方法。

7. d) 前記ポリオルガノシロキサン組成物を培養細胞を支持する固体手段中に組み込み、細胞培養基質を形成する段階を含むことを特徴とする請求の範囲第5項に記載の方法。

8. ポリオルガノシロキサン組成物を1級アミン含有シラン、カルボキシル基含有シラン、1級アミン含有シロキサンおよびカルボキシル基含有シ

ロキサンからなる群から選ばれた化合物からなる近接層とコーキユアーすることを含むポリオルガノシロキサン組成物の表面処理方法。

9. 培養細胞を支持する固体手段を含み、該固体手段が、請求の範囲第1項、第2項、第3項または第4項に記載のポリオルガノシロキサン組成物を含む少なくとも一表面を持つことを特徴とする細胞培養基質。

10. 前記固体手段がマルチウェルポリスチレンプレートであることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の細胞培養基質。

11. 前記ウェルの各々がその底部に前記ポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする請求の範囲第10項に記載の細胞培養基質。

12. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部と積層物を形成することを特徴とする請求の範囲第11項に記載の細胞培養基質。

13. 前記ウェルの各々の実質的に全ウェル底部が前記ポリオルガノシロキサン組成物の単一層を含

み、かつ前記ウェルの各々の実質的に全ウェル底部が前記ポリオルガノシロキサン組成物の単一層を含むことを特徴とする請求の範囲第17項に記載の細胞培養基質。

19. 前記ウェルの各々の実質的に全ウェル底部が前記ポリオルガノシロキサン組成物の単一層を含むことを特徴とする請求の範囲第17項に記載の細胞培養基質。

20. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部に有るアンカーリングに接合していることを特徴とする請求の範囲第19項に記載の細胞培養基質。

21. 一つ以上のウェルを有する少なくとも一つの細胞培養プレートを含み、前記ウェルが各々生体適合性ポリオルガノシロキサン組成物で作られるエラストマー状膜で少なくとも部分的に形成される実質的に平らな底部を有し、前記エラストマー状膜に真空の引張り力を制御的に加える真空手段を含むことを特徴とする細胞培養に応力を与える装置。

22. 前記真空手段が、制御手段により真空源に接続される真空プレナムを含み、前記培養プレート

を含むことを特徴とする請求の範囲第11項に記載の細胞培養基質。

14. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部に有るアンカーリングに接合していることを特徴とする請求の範囲第13項に記載の細胞培養基質。

15. ポリオルガノシロキサン組成物を含む少なくとも一表面を持ち、細胞培養を支持する固体手段を含み、前記ポリオルガノシロキサン組成物の表面を請求の範囲第5項、第6項、第7項または第8項に記載の方法で処理することを特徴とする細胞培養基質。

16. 前記固体手段がマルチウェルポリスチレンプレートであることを特徴とする請求の範囲第15項に記載の細胞培養基質。

17. 前記ウェルの各々がその底部に前記ポリオルガノシロキサン組成物を含むことを特徴とする請求の範囲第16項に記載の細胞培養基質。

18. 前記ポリオルガノシロキサン組成物が前記ウェルの各々の底部と積層物を形成することを特

が前記真空プレナムにより担持され、かつ該真空プレナムと接触し、前記真空プレナムが前記真空を前記エラストマー状膜の底面に連絡する手段を含むことを特徴とする請求の範囲第21項に記載の装置。

23. 前記真空プレナムが少なくとも一つの真空溝をその上表面に有する平らな板であり、前記プレナムの上表面に隣接し、前記培養プレートの下部に位置する実質的に平らなガスケットを含み、前記ガスケットが貫通した1つ以上のアパチャーを有し、該アパチャーが下部に有る真空溝と上部に有る培養プレートのエラストマー状膜と一致して配列されかつ両者の間に伸びており、シールされたエアチェンバーが形成され、該エアチェンバーはエラストマー状膜から、アパチャーと真空溝等を経由して前記真空源に至ることを特徴とする請求の範囲第22項に記載の装置。

24. 前記プレナムと前記真空源の間に配置された流通手段を含み、真空の前記真空プレナムへの運用を制御する制御手段を含むことを特徴とする請

次の範囲第23項に記載の装置。

15. 前記流通手段がソレノイドバルブであり、前記制御手段が前記ソレノイドバルブに電気的に接続されるコンピューターであることを特徴とする請求の範囲第24項に記載の装置。J

特表平2-501529 (11)

国際調査報告

International Application No. PCT/US88/01459

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
Inventor(s): [Name(s)] IPC Class. (Int. Pat. Classification): 428/116, 427/300, 427/301, 427/302, 427/303, 427/304, 427/305, 427/306, 427/307, 427/308, 427/309, 427/310, 427/311, 427/312, 427/313, 427/314, 427/315, 427/316, 427/317, 427/318, 427/319, 427/320, 427/321, 427/322, 427/323, 427/324, 427/325, 427/326, 427/327, 427/328, 427/329, 427/330, 427/331, 427/332, 427/333, 427/334, 427/335, 427/336, 427/337, 427/338, 427/339, 427/340, 427/341, 427/342, 427/343, 427/344, 427/345, 427/346, 427/347, 427/348, 427/349, 427/350, 427/351, 427/352, 427/353, 427/354, 427/355, 427/356, 427/357, 427/358, 427/359, 427/360, 427/361, 427/362, 427/363, 427/364, 427/365, 427/366, 427/367, 427/368, 427/369, 427/370, 427/371, 427/372, 427/373, 427/374, 427/375, 427/376, 427/377, 427/378, 427/379, 427/380, 427/381, 427/382, 427/383, 427/384, 427/385, 427/386, 427/387, 427/388, 427/389, 427/390, 427/391, 427/392, 427/393, 427/394, 427/395, 427/396, 427/397, 427/398, 427/399, 427/400, 427/401, 427/402, 427/403, 427/404, 427/405, 427/406, 427/407, 427/408, 427/409, 427/410, 427/411, 427/412, 427/413, 427/414, 427/415, 427/416, 427/417, 427/418, 427/419, 427/420, 427/421, 427/422, 427/423, 427/424, 427/425, 427/426, 427/427, 427/428, 427/429, 427/430, 427/431, 427/432, 427/433, 427/434, 427/435, 427/436, 427/437, 427/438, 427/439, 427/440, 427/441, 427/442, 427/443, 427/444, 427/445, 427/446, 427/447, 427/448, 427/449, 427/450, 427/451, 427/452, 427/453, 427/454, 427/455, 427/456, 427/457, 427/458, 427/459, 427/460, 427/461, 427/462, 427/463, 427/464, 427/465, 427/466, 427/467, 427/468, 427/469, 427/470, 427/471, 427/472, 427/473, 427/474, 427/475, 427/476, 427/477, 427/478, 427/479, 427/480, 427/481, 427/482, 427/483, 427/484, 427/485, 427/486, 427/487, 427/488, 427/489, 427/490, 427/491, 427/492, 427/493, 427/494, 427/495, 427/496, 427/497, 427/498, 427/499, 427/500, 427/501, 427/502, 427/503, 427/504, 427/505, 427/506, 427/507, 427/508, 427/509, 427/510, 427/511, 427/512, 427/513, 427/514, 427/515, 427/516, 427/517, 427/518, 427/519, 427/520, 427/521, 427/522, 427/523, 427/524, 427/525, 427/526, 427/527, 427/528, 427/529, 427/530, 427/531, 427/532, 427/533, 427/534, 427/535, 427/536, 427/537, 427/538, 427/539, 427/540, 427/541, 427/542, 427/543, 427/544, 427/545, 427/546, 427/547, 427/548, 427/549, 427/550, 427/551, 427/552, 427/553, 427/554, 427/555, 427/556, 427/557, 427/558, 427/559, 427/560, 427/561, 427/562, 427/563, 427/564, 427/565, 427/566, 427/567, 427/568, 427/569, 427/570, 427/571, 427/572, 427/573, 427/574, 427/575, 427/576, 427/577, 427/578, 427/579, 427/580, 427/581, 427/582, 427/583, 427/584, 427/585, 427/586, 427/587, 427/588, 427/589, 427/590, 427/591, 427/592, 427/593, 427/594, 427/595, 427/596, 427/597, 427/598, 427/599, 427/600, 427/601, 427/602, 427/603, 427/604, 427/605, 427/606, 427/607, 427/608, 427/609, 427/610, 427/611, 427/612, 427/613, 427/614, 427/615, 427/616, 427/617, 427/618, 427/619, 427/620, 427/621, 427/622, 427/623, 427/624, 427/625, 427/626, 427/627, 427/628, 427/629, 427/630, 427/631, 427/632, 427/633, 427/634, 427/635, 427/636, 427/637, 427/638, 427/639, 427/640, 427/641, 427/642, 427/643, 427/644, 427/645, 427/646, 427/647, 427/648, 427/649, 427/650, 427/651, 427/652, 427/653, 427/654, 427/655, 427/656, 427/657, 427/658, 427/659, 427/660, 427/661, 427/662, 427/663, 427/664, 427/665, 427/666, 427/667, 427/668, 427/669, 427/670, 427/671, 427/672, 427/673, 427/674, 427/675, 427/676, 427/677, 427/678, 427/679, 427/680, 427/681, 427/682, 427/683, 427/684, 427/685, 427/686, 427/687, 427/688, 427/689, 427/690, 427/691, 427/692, 427/693, 427/694, 427/695, 427/696, 427/697, 427/698, 427/699, 427/700, 427/701, 427/702, 427/703, 427/704, 427/705, 427/706, 427/707, 427/708, 427/709, 427/710, 427/711, 427/712, 427/713, 427/714, 427/715, 427/716, 427/717, 427/718, 427/719, 427/720, 427/721, 427/722, 427/723, 427/724, 427/725, 427/726, 427/727, 427/728, 427/729, 427/730, 427/731, 427/732, 427/733, 427/734, 427/735, 427/736, 427/737, 427/738, 427/739, 427/740, 427/741, 427/742, 427/743, 427/744, 427/745, 427/746, 427/747, 427/748, 427/749, 427/750, 427/751, 427/752, 427/753, 427/754, 427/755, 427/756, 427/757, 427/758, 427/759, 427/760, 427/761, 427/762, 427/763, 427/764, 427/765, 427/766, 427/767, 427/768, 427/769, 427/770, 427/771, 427/772, 427/773, 427/774, 427/775, 427/776, 427/777, 427/778, 427/779, 427/780, 427/781, 427/782, 427/783, 427/784, 427/785, 427/786, 427/787, 427/788, 427/789, 427/790, 427/791, 427/792, 427/793, 427/794, 427/795, 427/796, 427/797, 427/798, 427/799, 427/800, 427/801, 427/802, 427/803, 427/804, 427/805, 427/806, 427/807, 427/808, 427/809, 427/810, 427/811, 427/812, 427/813, 427/814, 427/815, 427/816, 427/817, 427/818, 427/819, 427/820, 427/821, 427/822, 427/823, 427/824, 427/825, 427/826, 427/827, 427/828, 427/829, 427/830, 427/831, 427/832, 427/833, 427/834, 427/835, 427/836, 427/837, 427/838, 427/839, 427/840, 427/841, 427/842, 427/843, 427/844, 427/845, 427/846, 427/847, 427/848, 427/849, 427/850, 427/851, 427/852, 427/853, 427/854, 427/855, 427/856, 427/857, 427/858, 427/859, 427/860, 427/861, 427/862, 427/863, 427/864, 427/865, 427/866, 427/867, 427/868, 427/869, 427/870, 427/871, 427/872, 427/873, 427/874, 427/875, 427/876, 427/877, 427/878, 427/879, 427/880, 427/881, 427/882, 427/883, 427/884, 427/885, 427/886, 427/887, 427/888, 427/889, 427/890, 427/891, 427/892, 427/893, 427/894, 427/895, 427/896, 427/897, 427/898, 427/899, 427/900, 427/901, 427/902, 427/903, 427/904, 427/905, 427/906, 427/907, 427/908, 427/909, 427/910, 427/911, 427/912, 427/913, 427/914, 427/915, 427/916, 427/917, 427/918, 427/919, 427/920, 427/921, 427/922, 427/923, 427/924, 427/925, 427/926, 427/927, 427/928, 427/929, 427/930, 427/931, 427/932, 427/933, 427/934, 427/935, 427/936, 427/937, 427/938, 427/939, 427/940, 427/941, 427/942, 427/943, 427/944, 427/945, 427/946, 427/947, 427/948, 427/949, 427/950, 427/951, 427/952, 427/953, 427/954, 427/955, 427/956, 427/957, 427/958, 427/959, 427/960, 427/961, 427/962, 427/963, 427/964, 427/965, 427/966, 427/967, 427/968, 427/969, 427/970, 427/971, 427/972, 427/973, 427/974, 427/975, 427/976, 427/977, 427/978, 427/979, 427/980, 427/981, 427/982, 427/983, 427/984, 427/985, 427/986, 427/987, 427/988, 427/989, 427/990, 427/991, 427/992, 427/993, 427/994, 427/995, 427/996, 427/997, 427/998, 427/999, 427/1000.	
2. FIELD OF SEARCH	
3. SUMMARY OF THE INVENTION	
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS	
5. REFERENCE TO THE PRIOR ART	
6. STATEMENT OF THE INVENTOR	
7. ABSTRACT	
8. CLAIMS	
9. DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS	
10. OTHER MATTER	
11. SIGNATURE	
12. DATE	
13. ADDRESS	
14. ATTORNEY	
15. OTHER MATTER	
16. OTHER MATTER	
17. OTHER MATTER	
18. OTHER MATTER	
19. OTHER MATTER	
20. OTHER MATTER	
21. OTHER MATTER	
22. OTHER MATTER	
23. OTHER MATTER	
24. OTHER MATTER	
25. OTHER MATTER	
26. OTHER MATTER	
27. OTHER MATTER	
28. OTHER MATTER	
29. OTHER MATTER	
30. OTHER MATTER	
31. OTHER MATTER	
32. OTHER MATTER	
33. OTHER MATTER	
34. OTHER MATTER	
35. OTHER MATTER	
36. OTHER MATTER	
37. OTHER MATTER	
38. OTHER MATTER	
39. OTHER MATTER	
40. OTHER MATTER	
41. OTHER MATTER	
42. OTHER MATTER	
43. OTHER MATTER	
44. OTHER MATTER	
45. OTHER MATTER	
46. OTHER MATTER	
47. OTHER MATTER	
48. OTHER MATTER	
49. OTHER MATTER	
50. OTHER MATTER	
51. OTHER MATTER	
52. OTHER MATTER	
53. OTHER MATTER	
54. OTHER MATTER	
55. OTHER MATTER	
56. OTHER MATTER	
57. OTHER MATTER	
58. OTHER MATTER	
59. OTHER MATTER	
60. OTHER MATTER	
61. OTHER MATTER	
62. OTHER MATTER	
63. OTHER MATTER	
64. OTHER MATTER	
65. OTHER MATTER	
66. OTHER MATTER	
67. OTHER MATTER	
68. OTHER MATTER	
69. OTHER MATTER	
70. OTHER MATTER	
71. OTHER MATTER	
72. OTHER MATTER	
73. OTHER MATTER	
74. OTHER MATTER	
75. OTHER MATTER	
76. OTHER MATTER	
77. OTHER MATTER	
78. OTHER MATTER	
79. OTHER MATTER	
80. OTHER MATTER	
81. OTHER MATTER	
82. OTHER MATTER	
83. OTHER MATTER	
84. OTHER MATTER	
85. OTHER MATTER	
86. OTHER MATTER	
87. OTHER MATTER	
88. OTHER MATTER	
89. OTHER MATTER	
90. OTHER MATTER	
91. OTHER MATTER	
92. OTHER MATTER	
93. OTHER MATTER	
94. OTHER MATTER	
95. OTHER MATTER	
96. OTHER MATTER	
97. OTHER MATTER	
98. OTHER MATTER	
99. OTHER MATTER	
100. OTHER MATTER	

International Application No. PCT/US88/01459

FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET

1. CLAIMS

2. SUMMARY OF THE INVENTION

3. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

4. REFERENCE TO THE PRIOR ART

5. STATEMENT OF THE INVENTOR

6. ABSTRACT

7. CLAIMS

8. DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

9. OTHER MATTER

10. OTHER MATTER

11. OTHER MATTER

12. OTHER MATTER

13. OTHER MATTER

14. OTHER MATTER

15. OTHER MATTER

16. OTHER MATTER

17. OTHER MATTER

18. OTHER MATTER

19. OTHER MATTER

20. OTHER MATTER

21. OTHER MATTER

22. OTHER MATTER

23. OTHER MATTER

24. OTHER MATTER

25. OTHER MATTER

26. OTHER MATTER

27. OTHER MATTER

28. OTHER MATTER

29. OTHER MATTER

30. OTHER MATTER

31. OTHER MATTER

32. OTHER MATTER

33. OTHER MATTER

34. OTHER MATTER

35. OTHER MATTER

36. OTHER MATTER

37. OTHER MATTER

38. OTHER MATTER

39. OTHER MATTER

40. OTHER MATTER

41. OTHER MATTER

42. OTHER MATTER

43. OTHER MATTER

44. OTHER MATTER

45. OTHER MATTER

46. OTHER MATTER

47. OTHER MATTER

48. OTHER MATTER

49. OTHER MATTER

50. OTHER MATTER

51. OTHER MATTER

52. OTHER MATTER

53. OTHER MATTER

54. OTHER MATTER

55. OTHER MATTER

56. OTHER MATTER

57. OTHER MATTER

58. OTHER MATTER

59. OTHER MATTER

60. OTHER MATTER

61. OTHER MATTER

62. OTHER MATTER

63. OTHER MATTER

64. OTHER MATTER

65. OTHER MATTER

66. OTHER MATTER

67. OTHER MATTER

68. OTHER MATTER

69. OTHER MATTER

70. OTHER MATTER

71. OTHER MATTER

72. OTHER MATTER

73. OTHER MATTER

74. OTHER MATTER

75. OTHER MATTER

76. OTHER MATTER

77. OTHER MATTER

78. OTHER MATTER

79. OTHER MATTER

80. OTHER MATTER

81. OTHER MATTER

82. OTHER MATTER

83. OTHER MATTER

84. OTHER MATTER

85. OTHER MATTER

86. OTHER MATTER

87. OTHER MATTER

88. OTHER MATTER

89. OTHER MATTER

90. OTHER MATTER

91. OTHER MATTER

92. OTHER MATTER

93. OTHER MATTER

94. OTHER MATTER

95. OTHER MATTER

96. OTHER MATTER

97. OTHER MATTER

98. OTHER MATTER

99. OTHER MATTER

100. OTHER MATTER

Part VI Attachment

- I. Claims 1-9, 21-29, and 36-44, drawn to the treated resin/substrate composition, classified in Class 428, subclass 116.
- II. Claims 10-20, and 30-35, drawn to methods of treating a surface and to a product made by those methods, classified in Class 427, subclass 337.
- III. Claims 45-49, drawn to the combination of a vacuum means and a culture plate, classified in Class 423, subclass 284.